

Sosiaalisen ympäristön vaikutus  
argentiinanmuurahaisen  
(*Linepithema humile*)  
immuunigeenien ekspressioon

Lauri Johannes Oksanen

Pro-gradu –tutkielma  
Oulun yliopisto  
Biologian tutkinto-ohjelma  
Marraskuu 2020



<b>Tekijä (Sukunimi ja etunimet), opiskelijanumero:</b> Oksanen, Lauri Johannes, 2258805	<b>Tutkielman sivumäärä:</b> 39 sivua
<b>Työn nimi:</b> Sosiaalisen ympäristön vaikutus argentiinanmuurahaisen ( <i>Linepithema humile</i> ) immuunigeenien ekspressioon	
<b>Asiasanat:</b> muurahaiset, <i>Linepithema humile</i> , hyönteisten immunitetti, sosiaalinen immunitetti, qPCR	
<b>Tiivistelmä:</b> <p>Muurahaiset ovat aitosiaalisia hyönteisiä, joiden yhdyskuntarakenne perustuu sukulaisvalintaan ja tehtävät jakavaan kastijärjestelmään. Muurahaispesä muodostaa niin kutsutun superorganismien, joka voi koostua jopa miljoonista yksilöistä. Eräitä suurimpia superorganismeja ovat argentiinanmuurahaisen (<i>Linepithema humile</i>) maailmalle ihmisen mukana Etelä-Amerikasta levinneet massiiviset, jopa tuhansien kilometrien laajuiset superkoloniat. Argentiinanmuurahaiset ovat monin paikoin hyvin haitallisia tuholaisia, jotka ovat uhka niin taloudellisesti kuin paikallisille endeemisille lajeillekin. Hyönteisillä ei selkärangaisista poiketen ole lainkaan adaptiivista hankinnaista immuunisysteemiä, vaan niiden immuunivaste perustuu pelkästään sisäisen ei-adaptiivisen immunitetin aktivaatioon. Se on kuitenkin hyvin monipuolinen ja kykenee vastaamaan eri patogeenien muodostamiin uhkiin. Pääpiirteissään hyönteisten immuunijärjestelmä perustuu Toll- ja Imd-signaalointireittien aktivaatioon ja niiden tuloksena aktivoituvaa spesifiseen vasteeseen. Aitososiaalisilla hyönteisillä on yksineläviä suurempi patogeenipaine ja niille on kehittynyt erilaisia sosiaalisen immunitetin muotoja, esim. sairaiden yksilöiden poistaminen pesästä ja pesätoverien sukuminen. Tehokas sosiaalisen immunitetti voi laskea yksilötason immunitetin kustannuksia ja panostusta.</p> <p>Pro-gradu –tutkimuksessani tarkastelin sosiaalisen ympäristön neljän immuunigeenin ekspressioon <i>L. humile</i> -kuningattarilla, riippuen siitä olivat ne olleet patogeenialtistuksen (<i>Serratia marcescens</i>) jälkeen eristettynä vai työläisten seurassa. Oletukseni oli, että työläisten seurassa olleilla kuningattarilla olisi alhaisempi immuunivaste. Kvantifioin geenien suhteellisen ekspressiotason kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR) ja analysoin tuloksia kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). Tulosten perusteella ei ollut nähtävissä tilastollisesti merkittävää yhteyttä sosiaalisuuden ja immuunigeenien ekspressiotason välillä. Tämä käy yksiin myös muiden viimeaikaisten tutkimusten kanssa, joiden perusteella näyttäisi siltä, että sosiaalinen immunitetti ei korvaa yksilötason immunitettia vaan täydentää sitä. Aihetta on syytä tutkia vielä paljon lisää suuremmilla näytemäärillä ja monipuolisemmilla analyysimenetelmillä.</p>	
<b>Muita tietoja:</b>	
<b>Päiväys:</b> 27 / 11 / 2020 <b>Laatijan allekirjoitus:</b> _____	

# Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
1.1	Muurahaiset .....	1
1.2	Argentiinanmuurahainen ( <i>Linepithema humile</i> ).....	4
1.3	Hyönteisten immuunipuolustus .....	6
1.4	Sosiaalinen immunitetti.....	8
1.5	Tutkimuksen tarkoitus .....	9
2	Materiaalit ja menetelmät .....	10
2.1	Koejärjestely .....	10
2.2	Patogeenialtistus .....	11
2.3	Geeniekspression määrittäminen .....	11
2.4	Tilastolliset analyysit .....	17
3	Tulokset .....	18
3.1	Immuunigeenien suhteellinen ekspressiotaso eri käsittelyillä .....	18
3.1.1	<i>Gram Negative Binding Protein 1-1</i> .....	18
3.1.2	<i>Peptidoglycan Recognition Protein LC</i> .....	19
3.1.3	<i>Thioester-containing protein 3</i> .....	21
3.1.4	<i>Hymenoptaecin</i> .....	22
3.2	Sekvensoinnin tulokset .....	24
4	Pohdinta.....	25
5	Yhteenveto.....	28
6	Kiitokset .....	29
7	Lähteet .....	29

# 1 Johdanto

Muurahaiset ovat eliökunnan menestyjiä. Sopeutuvaisuutensa ja sosiaalisen yhdyskunnallisen elämisen etujen ansiosta sadoista, tuhansista tai jopa miljoonista yksilöistä koostuvat muurahaisten niin kutsutut superorganismit ovat levinneet kaikkialle maailmaan ja niiden ekologinen merkitys on valtava. Yhteisöllisen elämisen varjopuolena muurahaisiin kohdistuu myös valtava patogeenipaine, jota niiden sisäinen yksilötason immuunijärjestelmä ei riittä yksinään torjumaan. Sitä täydentää niin kutsuttu sosiaalinen yhdyskuntatason immuniteetti, erilaiset kehittyneet käyttäytymismallit, joilla sosiaaliset eliöt pyrkivät ehkäisemään tautien leviämistä. Tässä tutkielmassa käsitellän sosiaalisen immuniteetin ja yksilötason immuunivasteen välistä vuorovaikutusta argentiinanmuurahaisilla.

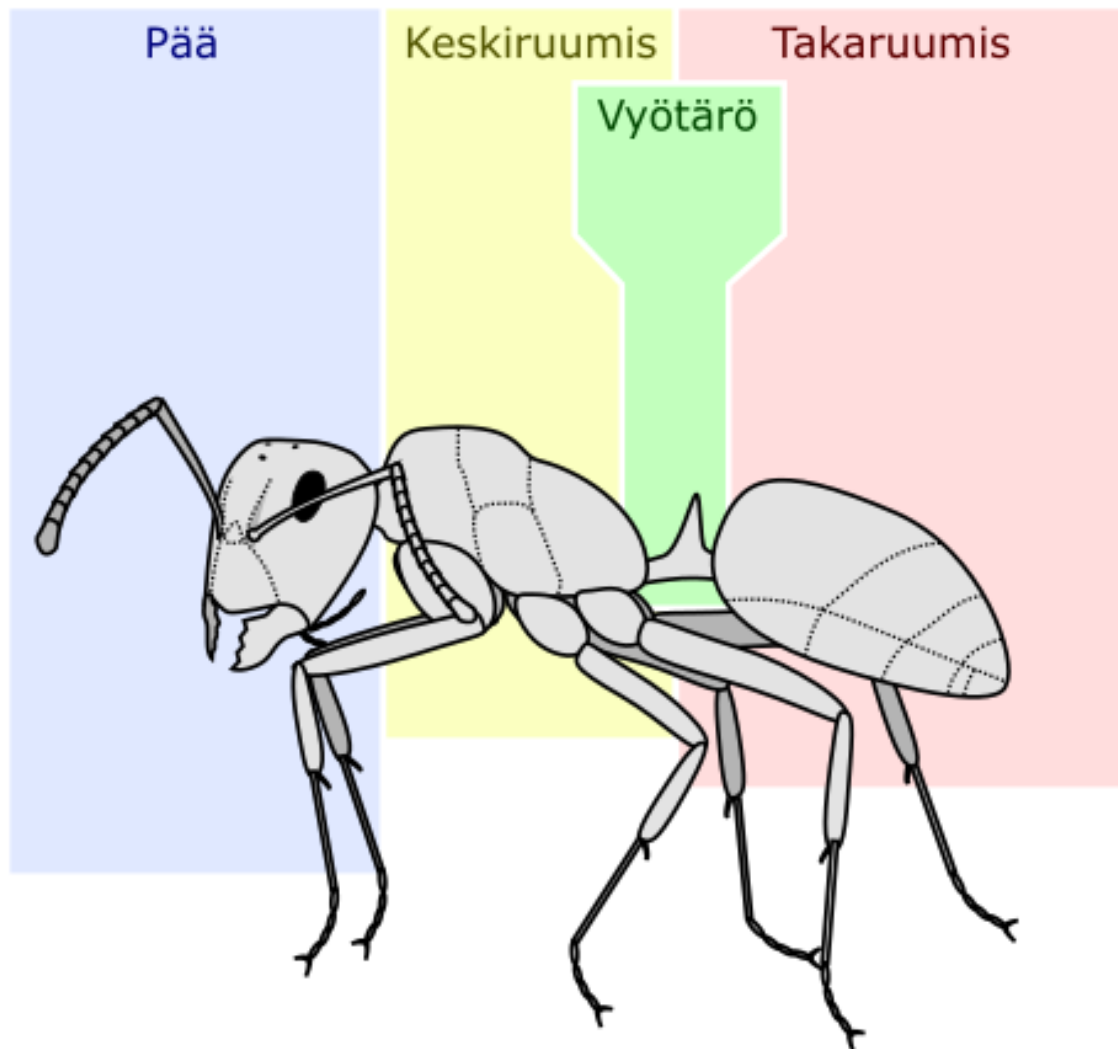
## 1.1 Muurahaiset

Muurahaisia tutkivaa biologian alaa kutsutaan myrmekologiaksi. Muurahaisten fysiologiaa, käyttäytymistä ja pesiä on tutkittu jo satojen vuosien ajan. Tieteellisessä tutkimuksessa niitä on käytetty mallilajeina tutkittaessa mm. sosiobiologiaa, evoluutiota ja sukulaisvalintaa (Kennedy 2017). Nykyään monien muurahaislajien genomit on sekvensoitu (mm. Gadau ym. 2012) Hymenoptera Genome Database-tietokantaan (Elsik ym. 2016).

Muurahaiset ovat eu- eli aitososiaalisia hyönteisiä. Niiden heimo on *Formicidae* ja ne kuuluvat yhdessä muiden pistiäisten kanssa *Hymenoptera* -lahkoon. Muurahaisten heimo on evolutiivisesti hyvin vanha ja ne erkaantuivat ampiaisten kanssa yhteisestä kantamuodosta yli satamiljoonaa vuotta sitten liitukaudella (Ward 2014). Vaikka muilla pistiäisheimoilla esiintyykin paljon yksineläviä lajeja, ovat kaikki tunnetut muurahaislajit yhteisöllisiä ja aitososiaalisia (Bourke & Franks 1995). Muurahaisten heimoon kuuluu 19 alaheimoa, joista kolme on kuollut sukupuuttoon. Nykyisin eläviä lajeja tunnetaan 12000 ja arviolta niitä saattaa olla jopa 22000 (Ward 2014).

Muurahaisilla on muiden hyönteisten tapaan kova kitiinikuori, verkkosilmät, kuusi jalkaa ja kolmiosainen vartalo. Niiden rakenteellisia tunnusmerkkejä ovat kapea vyötärö ja polvinivelelliset herkäät tuntosarvet (Kuva 1). Sisäisenä erikoistumisena niillä on kaksijakoinen vatsa, joka jakautuu muille yksilöille oksennettavaa ravintoa säilövään ”sosiaaliseen” vatsaan

ja yksilön omaan käyttöön tulevaa ravintoa sulattavaan vatsaan. Yksilönkehityksessään muurahaiset käyvät läpi täydellisen nelivaiheisen muodonmuutoksen. Kuningatar munii munan, jonka työläiset keräävät ja hoitavat toukkaa, joka kokee kotelossa muodonmuutoksen aikuiseksi (Hölldobler & Wilson 1990).



**Kuva 1.** Tyypillisen muurahaisen rakenne, kuvassa suomumurahainen (*Formicinae*). Muokattu kuvasta Jpant (2006): Simplified drawing of ant, Wikipedia 2020, CC BY.

Muurahaisyhdyskunnan rakenne perustuu kastijärjestelmään, jossa pesän ylläpitämiseksi tehtävät on jaettu eri kasteille. Kastit poikkeavat toisistaan sekä kokonsa että tehtäviensä perusteella. Munien ja toukkien saama hoito ja ravinto ratkaisevat mihin kastiin yksilöt kasvavat. Naaraat syntyvät hedelmöitetystä diploideista munista, koiraat taas hedelmöittämättömistä ja ovat siis haploideja. Kuningattaret ovat yleensä kasteista kookkaimpia ja niiden päätehtävä on uusien yksilöiden tuottaminen ja uusien pesien perustaminen. Kuhnureiksi kutsutut koiraat taas elävät vain paritellakseen kuningattaren

kanssa. Työläiset ovat kaikki naaraita ja toisilleen hyvin läheistä sukua, minkä on ajateltu selittävän niiden altruistista uhrautumista kolonian ja kuningattaren edun vuoksia. Tätä kutsutaan sukulaisvalinnaksi. Ne ovat yleensä steriilejä, vaikka lajikohtaisia poikkeuksiaakin on. Joillain lajeilla työläiset ovat erikoistuneet vielä alakasteihin, esim. sotilaiksi tai eläviksi mesisäiliöiksi. Koloniassa voi lajista riippuen olla vain yksi kuningatar (monogynia) tai monia (polygynia). Lisääntymisaikaan sukukypsille kuningattarille ja koiraille kasvaa siivet ja ne parittelevat. Monogyynisillä lajeilla on yleensä parveilulento, jonka jälkeen hedelmöitetyt kuningattaret lähtevät perustamaan uusia pesiä. Polygyynisillä lajeilla kuningattaret taas eivät yleensä poistu pesästä. Muurahaiskolonia muodostaa niin kutsutun superorganismin, jolla on yhdyskuntatason emergenttejä kompleksisia ominaisuuksia, jotka eivät selity pelkästään yksittäisen muurahaisen ominaisuuksilla. Näitä ovat esimerkiksi ongelmanratkaisu, tehokas sopeutuminen ja erilaiset sosiaalisen immunitetin muodot. Superorganismi on siis enemmän kuin vain osiensa summa. Kolonia asettuu yleensä asumaan pesiin, mutta jotkin lajit kuten vaeltajamuurahaiset elävät jatkuvassa liikkeessä. Muurahaiset kommunikoivat keskenään feromonien, äänen ja kosketuksen avulla. Monet muurahaislajit elävät symbioosissa muiden eliöiden kanssa, esim. mettä tuottavien kirvojen, ravintoa antavien sienien (Suen ym. 2011) tai suojaa tarjoavien puiden kanssa (Hölldobler & Wilson 1990).

Muurahaisilla on valtava ekologinen merkitys. Arvioidaan että maailmassa on yli kymmenentuhattabiljoonaa muurahaisyksilöä ja niiden biomassassa on ylivoimaisesti eläinkunnan suurin. Muurahaiset ovat levinneet kaikkialle maailmaan napa-alueita ja joitain hyvin eristäytyneitä saaria lukuun ottamatta. Aitososiaalisuus on tehnyt niistä menestyjiä, jotka sopeutuvat hyvin moniin eri olosuhteisiin ja ravinnonlähteisiin. Valitettavasti monet muurahaislajit ovat myös hyvin haitallisia tuholaisia ja vieraslajeja, jotka syövät ja hävittävät levinneisyysalueidensa endeemiset lajit. Tarpeeksi suureksi kasvanutta muurahaiskoloniaa on myös erittäin vaikea pysyvästi hävittää, superkolonioita muodostavien lajien kohdalla käytännössä mahdotonta (Holway ym. 2002).

## 1.2 Argentiinanmuurahainen (*Linepithema humile*)

Argentiinanmuurahainen (*Linepithema humile*) on pieni ruskeanmusta muurahainen (kuva 2), joka nimensä mukaisesti on peräisin Argentiinan sademetsistä. Se on hyvin yleinen kautta koko Etelä-Amerikan ja sitä tavataan mantereella ainakin Argentiinassa, Uruguayssa, Paraguayssa, Boliviassa sekä Brasiliassa (Wild 2009). Sieltä se on levinnyt koko maailman välimerellisen ilmaston maihin ja ympäristöihin, joiden kuumat kesät ja leudot talvet tarjoavat lajille ihanteelliset menestymismahdollisuudet (Suarez ym. 2000). Argentiinanmuurahainen on levinnyt ihmisen mukana 1800-luvun lopulta lähtien, ilmeisimmin tärkeiden kauppareittien mukana kulkien Argentiinan kauppakaupunki Rosarion seuduilta (Suarez ym. 2008). Argentiinanmuurahaisten menestys uusilla levinneisyysalueilla on ollut sekä ihmisille että paikalliselle luonnolle vitsaus, sillä ne ovat sitkeitä ja invasiivisia vieraslajituholaisia (Vogel ym. 2010).



**Kuva 2.** Argentiinanmuurahaistyöläinen. Exilpatriot (2015): Large worker ant found in Southern California. Wikipedia 2020, CC BY.

Argentiinanmuurahaisten pesissä on satoja kuningattaria ja tuhansittain generalistityöläisiä, joilla ei ilmeisesti ole erikoistuneita alakasteja. Kuningattarille ja kuhnureille kasvaa siivet, mutta ne eivät yleensä poistu pesästä. Ruokavalionsa ja ympäristönsä suhteen ne ovat opportunistisia generalisteja, jotka menestyvät hyvin häirityissä ja ihmisen muokkaamissa ympäristöissä. Muita muurahaislajeja ja yleisesti muita hyönteisiä kohtaan argentiinanmuurahaiset käyttäytyvät hyvin aggressiivisesti ja valtaavat niiden elinalueet ja resurssit. Tämän arvellaan johtuvan lajin kehittymisestä Etelä-Amerikan sademetsien suurissa kilpailupaineissa ja korostuneen sen levitessä maailmalle vieraslajina. Ei myöskään tunneta *L. humileen* erikoistuneita petoja tai parasiitteja, jotka olisivat voineet rajoittaa niiden leviämiskäyttäytymistä. (Suarez ym. 2008).

Tärkein syy argentiinanmuurahaisten menestykselle on niiden kyky muodostaa valtavia, miljoonista yksilöistä koostuvia niin kutsuttuja superkolonioita, joissa eri pesät sulautuvat saumattomasti toisiinsa. Samaan superkoloniaan kuuluvat pesät ovat erittäin läheistä sukua keskenään eivätkä taistele keskenään, mitä kutsutaan unikoloniaalisuudeksi. Tämän on ajateltu johtuvan siitä, että argentiinanmuurahaiset ovat jopa muihin muurahaisiin ja sosiaalisiin hyönteisiin verrattuna keskenään poikkeuksellisen geneettisesti samankaltaisia, eli kilpailevatkin pesät tunnistetaan omiksi. Tämä on seurausta lajin leviämisestä maailmalle ainakin seitsemässä perimältään erilaisessa aallossa, minkä takia valtavat superkoloniat ovat pienten homogeenisten perustajapopulaatioiden jälkeläisiä. Ilmeisesti tämä vieraslajipopulaatioiden geneettinen samankaltaisuus on vielä entisestään lisännyt superkolonioiden kokoa, sillä Argentiinan natiivipopulaatioiden superkoloniat ovat huomattavasti pienempiä (Pedersen ym. 2006, Vogel ym. 2008). Geneettisen homogeenisuuden voisi ajatella altistavan koloniat taudeille ja parasiiteille, mutta ainakaan vielä tällaista ei argentiinanmuurahaisella ole havaittu (Ugelvig & Cremer 2012). Toisensa kohtaavat geneettisesti erilaiset superkoloniat eivät sulaudu vaan taistelevat, riippuen erilaisuuden asteesta. Menestynein tunnetuista argentiinanmuurahaisen superkolonioista on Etelä-Euroopan massiivinen, pisimmällään yli 6000 km pitkä Italiasta Espanjaan ulottuva kolonia (Giraud ym. 2002).

Argentiinanmuurahaisen genomi (näytteet Etelä-Euroopan superkoloniasta) on sekvensoitu vuonna 2010 (Smith ym. 2011) ja se on saatavilla julkisessa Hymenoptera Genome Database-tietokannassa. *L. humilella* havaittiin kaikki hyönteisten yleiset immuunipuolustusreitit, mutta sillä havaittiin olevan yleisesti mallilajeina käytettyihin *Drosophila* -suvun kärpäsiin verrattuna vähemmän kopioita immuunigeneistä, minkä voisi yhdessä geneettisen homogeenisuuden



kanssa olettaa asettavan sen alttiimmaksi tuhoisille koloniatason kulkutaukeille. Tehokkaasti sosiaalisen immunitetin oletetaan kompensoivan immuunigeenien vähyyttä. Metabolian kannalta tärkeiden sytokromi P450-geenien kopioita taas löydettiin poikkeuksellisen paljon, minkä arvellaan johtuvan argentiinanmuurahaisen generalistisesta ja sopeutuvaisesta ruokavaliosta. Saatavilla oleva genomitieto, laaja tutkimustieto argentiinanmuurahaisen käyttäytymisestä, ekologiasta ja levinneisyydestä sekä sen suuri taloudellinen ja ekologinen merkitys tekevät argentiinanmuurahaisesta monin tavoin ihanteellisen tutkimuslajin (Smith ym. 2011).

### 1.3 Hyönteisten immuunipuolustus

Hyönteisillä ei ole ihmisten ja muiden selkärankaisten lailla hankinnaista immuunipuolustusta, vaan ne joutuvat turvautumaan sekä kuivaan kitiinikuoreensa että sisäiseen, synnynnäiseen immunitettiin. Hyönteiset eivät siis pysty adaptiivisesti sopeutumaan uusiin immuunihaasteisiin, mutta niiden synnynnäinen immunitetti on kuitenkin hyvin monipuolinen ja robusti (Johnston & Rolff 2013). Hyönteisten immuunijärjestelmä joutuu vastaamaan niin sienten, loisten, bakteerien kuin virustenkin muodostamiin uhkiin. On myös havaittu, että altistuessaan uudelleen samalle patogeenille hyönteisten immuunipuolustus suojaa niitä tehokkaasti varsinaisen sopeutuvaisen ”muistin” puutteesta huolimatta (Ligoxygakis 2017). Suurin osa hyönteisten immuunijärjestelmästä saaduista tiedoista perustuu genetiikan yleisimmin käytetyllä malliorganismilla *Drosophila melanogasterilla* tehtyihin tutkimuksiin (Lemaitre & Hoffmann 2007, Sackton & Clark 2009), mutta tutkimusten perusteella vaikuttaisi siltä, että immuunigeenit ja -järjestelmä ovat kaikilla hyönteisillä hyvin samankaltaisia (Ferrandon ym. 2007, Viljakainen 2015). Sosiaalisilla hyönteisillä on havaittu *Drosophila* -suvun kärkeä verrattuna suurempaa immuunigeeneihin kohdistuvaa positiivista valintapainetta (Viljakainen ym. 2009).

Hyönteisillä ei ole erikseen verta ja imunestettä, vaan niitä vastaa ruumiinontelossa kiertävä hemolymfa. Hemolymfa koostuu lähinnä erilaisista valkosoluista eikä sillä ole ilmeisesti juurikaan merkitystä ravinteiden tai hapen kuljetuksen kannalta, vaan sen tehtävä on lähinnä immuunipuolustus. Myös hemolymfan väliaikainen (transientti) hyytyminen, melanisaatio ja haavasta ulos pullahtaminen ruumiinontelon sisäisen hypertension vuoksi estävät osaltaan patogeenien leviämistä hyönteisen elimistöön (Ferrandon ym. 2007).

Immuunipuolustus aktivoituu, kun tunnistinmolekyyli sitoutuu spesifisesti patogeenin ligandina toimivaan osaan ja aktivoi spesifiseen immuunivasteeseen johtavan signaaliproteiineista koostuvan signalointireitin. Hyönteisten immuunipuolustus perustuu pääasiallisesti Toll- ja IMD (immune deficiency)-signalointireittien aktivaatioon, joka johtaa spesifisesti patogeenista riippuvaan immuunipuolustusreaktioon. Näitä reittejä täydentävät JAK/STAT- ja JNK-signalointireitit. Pääasiallisia immuunivasteen indusoivia tunnisteyhdisteitä ovat bakteerien peptidoglykaanit ja glukaanit, joihin sitoutuvat tunnistinreseptorit aktivoivat spesifisesti signalointireittejä (Gillespie ym. 1997, Janeway & Medzhitov 2002). Signalointikaskaadin seurauksena toiminnoiltaan haimaa ja maksaa vastaavassa rasvaelimessä (hematopaneas) tuotetaan lyhyitä kationisia antimikrobiaalisia peptidejä, (Antimicrobial Peptides, AMP), jotka kulkeutuvat hemolymfaan ja tuhoavat patogeenin. Yleisesti ottaen Toll- ja IMD-reitit vastaavat mikrobipatogeenien aiheuttamiin uhkiin, kun taas JAK/STAT-reitti vastaa haavoittumisvasteista ja isompien parasiittien, kuten loispistiäisten toukat, torjunnasta (Evans ym. 2006).

Toll-signalointireitti on alun perin tunnistettu sen tärkeässä roolissa yksilönkehityksessä, johon liittyen sitä on laajalti tutkittu. Myöhemmin havaittiin sen olevan olennainen myös immuunipuoluksessa. Hyönteisillä Toll-reitti vastaa sekä Gram-positiivisten bakteerien että sieni-infektioiden tunnistuksesta ja niitä kohtaan suunnatun systeemisen immuunivasteen aktivoinnista. Tunnistinreseptorit GGBP1 (Gram-negative Binding Protein) ja PGRP-SA (Peptidoglycan Recognition Protein) vastaavat bakteerien Lys-peptidoglykaanin tunnistuksesta, kun taas GGBP3 tunnistaa sienet. Tunnistettuaan patogeenin ne käynnistävät proteolyttisen signalointikaskadin, jonka tuloksena Spätzle-sytokiini aktivoituu ja sitoutuu rasvaelimen solujen solukalvolla olevaan Toll-reseptoriin. Tämä aktivoi solun tuottamaan patogeenille spesifisesti AMP:itä ja aktivoi humoraalisia hemolymfan puolustusreaktioita kuten melanisaatiota (Lemaitre & Hoffmann 2007).

Toll-reitistä poiketen sen vastinparilla IMD-signalointireitillä ei ole havaittu olevan muuta funktiota kuin immuunipuolustus. Se vaikuttaisi olevan myös Toll-reittiä vähemmän konservoitunut, sillä joillain lajeilla kuten kirvoilla reitti saattaa puuttua kokonaan tai osittain (Gerardo ym. 2010). Gram-negatiivisia bakteereja tunnistavat vapaa PGRP-LE ja solukalvolla olevat transmembraaniset PGRP-LC-kompleksit sitoutuvat bakteerien DAP-peptidoglykaaniin ja aktivoivat solulimassa vapaana olevan IMD-välittäjäproteiinin. Tämä puolestaan aktivoi solunsisäisen signalointikaskadin, jonka tuloksena tuotetaan patogeenille spesifisiä AMP:eja.

Lisäksi IMD-reitti aktivoi lähinnä haavojen parantamiseen liittyvää JNK-signaalintireittiä (Lemaitre & Hoffmann 2007).

## 1.4 Sosiaalinen immunitetti

Sosiaalinen immunitetti tarkoittaa sosiaalisissa yhteisöissä eläville eliöille kehittyneitä sosiaalisia toimintamalleja, joilla ne pyrkivät ehkäisemään tautien ja loisten leviämistä yhteisössä. Sosiaalista immunitettia edistävää käytöstä on havaittu kautta eliökunnan selkärangattomista ihmisiin ja sen arvellaan olevan olennaisen tärkeää sosiaalisissa yhteisöissä elämisen kehittymisen kannalta (Cremer ym. 2007).

Eu- eli aitososiaalisille hyönteisille, kuten muurahaisille, taudit ovat vieläkin suurempi uhka kuin muille hyönteisille, sillä yhteisössä olevien yksilöiden välinen erittäin suuri geneettinen samankaltaisuus (Ugelvig ym. 2010), tiiviit elinolosuhteet ja usein kosteat elinympäristöt tarjoavat periaatteessa sienille, loisille, mikrobeille ja muille taudinaiheuttajille erinomaiset olosuhteet leviämiseen. Lisäksi monilla aitososiaalisilla hyönteisillä on havaittu olevan genomissaan vähemmän kopioita immuunigeneistä kuin yksinelävillä hyönteisillä kuten *Drosophila* -suvun kärpäsillä (Honeybee Genome Sequencing Consortium 2006). Onkin eräänlainen paradoksi, että sosiaalisia hyönteisiä ylipäättään on edelleen olemassa eivätkä ne ole kuolleet hyönteismaailman pandemioihin, vaan ne pikemminkin päinvastoin ovat hyönteismaailman todellisia menestyjiä (Wilson-Rich ym. 2009). Ratkaisu tähän paradoksiin on hyvin tehokas yhdyskuntatason sosiaalinen immuunipuolustus (Cremer ym. 2007).

Sosiaalisilla hyönteisillä on havaittu kehittyneen laaja valikoima erilaisia tautien leviämistä rajoittavia passiivisia ja aktiivisia käyttäytymismalleja, esimerkiksi luontaisesti antimikrobiaalisten materiaalien kuten männyn pihkan käyttö pesänrakennuksessa (Simone ym. 2009, Chapuisat ym. 2007, Brüttsch ym. 2017), pesätovereiden immuunipuolustuksen aktivoiminen sukimalla ja pesemällä niitä (Ugelvig & Cremer 2007, Theis ym. 2015), kuolleiden ja sairaiden yksilöiden tunnistaminen, eristäminen ja poistaminen pesästä (Aubert & Richard 2008, Heinze & Walter 2010, Kesäniemi ym. 2019, Richard ym. 2008), varoituskäyttäytyminen (ns. tanssit), oksennusnesteiden vaihto (Hamilton ym. 2010), symbioottinen suhde muiden eliöiden kanssa ja jälkeläisten koteloiden desinfioiminen muurahaishapolla (Pull ym. 2018). Pesän tärkeimpien yksilöiden eli kuningattarien suojeleminen on ensiarvoisen tärkeää, joten niitä suojellaan erityisen paljon esimerkiksi

jatkuvasti kuningattarien pesemiseen erikoistuneilla palvelijoilla tai fyysisesti eristämällä kuningatar muusta pesästä omaan kammioonsa (Cremer ym. 2007). Parhaimmillaan sosiaalinen immuuteetti voi olla niin tehokasta, että sen on havaittu alentavan tarvetta yksilötason immuunivasteelle (Simone ym. 2009, Chapuisat ym. 2007).

## 1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Pro gradu -tutkimuksessani, osana dosentti Lumi Viljakaisen laajempaa tutkimusta, pyrin selvittämään sosiaalisen ympäristön vaikutusta argentiinanmuurahaisen immuunigeenien ekspressioon. Tutkin argentiinanmuurahaiskuningattarien immuunigeenien aktivaatiota patogeeniselle bakteerille (*Serratia marcescens*) altistuksen jälkeen, riippuen siitä ovatko ne viettäneet altistuksen jälkeisen ajan eristettyinä yksin vai luonnollisemmassa sosiaalisessa ympäristössä työläisten kanssa. Aiempiin aitososiaalisilla hyönteisillä tehtyihin tutkimuksiin (Simone ym. 2009, Chapuisat ym. 2007) pohjautuen tutkimushypoteesini on, että sosiaalinen ympäristö laskee kuningattarien yksilötason immuunipuolustuksen aktivaatiota verrattuna eristettyinä olleisiin.

## 2 Materiaalit ja menetelmät

### 2.1 Koejärjestely

Tutkimuksessani käytin Espanjan Castell d'Arosta European Main –superkoloniasta (Giraud ym. 2002) keväällä 2011 (Viljakainen) kerättyjä argentiinanmuurahaisia, joita kasvatettiin keuhkotekoisissa pesissä Oulun yliopiston Ekologian ja Genetiikan tutkimusyksikön Sanyo-kasvatuskaapeissa, joiden valo- ja lämpösykliksi oli säädetty 14 h valoisaa (27 °C) ja 10 h pimeää (21 °C). Pesät olivat kannellisiin, ilma-aukollisiin muovilaatikoihin valetun kipsin päälle rakennettuja kolmikerroksisia muovitorneja, kuusi kammiota per kerros. Jokaisessa pesälaatikossa oli kymmeniä kuningattaria ja satoja työläisiä ja toukkia. Pesiä ylläpidettiin puhdistamalla ne ja ruokkimalla muurahaisia pilkotuilla jäädytetyillä torakoilla (*Nauphoeta cinerea*) ja hunajalla kolmesti viikossa sekä kostuttamalla pesien kipsipohja kerran viikossa hanavedellä. Sekä alustavia kokeita että varsinaista tutkimusta varten keräsin pesistä kuningattaria niin, että kaikki käytettävät kuningattaret olivat samasta pesästä mahdollisimman suuren geneettisen samankaltaisuuden varmistamiseksi. Näin pyrin minimoimaan mahdolliset geneettisistä eroista johtuvat vaihtelut tuloksissa.

Varsinaisessa tutkimuksessani tutkin argentiinanmuurahaiskuningattarien immuunigeenien aktivaatiota kahden eri käsittelyn ja näiden yhdistelmien suhteen (taulukko 1.) kolmella biologisella replikaatilla per käsittely-yhdistelmä. Valitsin tutkimukseen satunnaisesti yhteensä 12 kuningattarta ja 30 työläistä, jotka kaikki olivat alun perin samasta kasvatuspesästä geneettisen samankaltaisuuden maksimoimiseksi.

**Taulukko 1.** Tutkimuksen käsittely-yhdistelmät.

<u>Patogeenialtistus:</u>	<u>Sosiaalinen käsittely</u>	
	<b>Eristettynä 10 h</b>	<b>Työläisten kanssa 10 h</b>
<b><i>S. marcescens</i> -laimennos</b>	3 x kuningatar	3 x (kuningatar + 5 työläistä)
<b>LB-liuos (kontrolli)</b>	3 x kuningatar	3 x (kuningatar + 5 työläistä)

## 2.2 Patogeenialtistus

Aktivoin argentiinanmuurahaiskuningattarien immuunipuolustuksen pistämällä niitä bakteeriliuokseen kastetulla hyönteisneulalla (läpimitta 0,1 mm). Patogeenialtistukseen käytin *Serratia marcescens* –bakteeria, joka on *Enterobacteriaceae* –heimoon kuuluva gram-negatiivinen bakteeri. Se on hyvin yleinen patogeeni, joka infektoi niin ihmisiä, eläimiä, hyönteisiä kuin kasvejakin. Tutkimuksessa käytin *S. marcescensin* kantaa DB10, joka on yleisesti käytetty mallipatogeeni hyönteisillä. (Flyg ym. 1980). Tutkimusta varten kasvatin bakteereja Lysogeny broth-kasvatusliuoksessa (jatkossa LB-liuos).

Immuunireaktion aikaansaavaa pistosta varten tainnutin argentiinanmuurahaiskuningattaret väliaikaisesti jäillä ja pistin niitä takaruumiin toisen ja kolmannen tergiitin väliseen kutikulaan hyönteisneulalla, joka oli kastettu joko bakteerikäsittelyn kontrollina toimivaan puhtaaseen LB-liuokseen tai *S. marcescensia* sisältävään LB-liuokseen. Pistoksen jälkeen annoin kuningattarten viettää petrialjoilla (huoneenlämmössä, ravintona 10%–sokeriliuosta) 10h, jotta niiden immuunipuolustuksen geenit ehtivät aktivoitua. Tämän jälkeen jäädysin kuningattaret yksitellen sekä työläiset poolattuna siirtämällä ne erillisiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin, jotka jäädysin nopeasti kastamalla ne nestetyppeen. Säilytin kuningattaria ja työläisiä kokeiden seuraavaa vaihetta varten -80°C:ssä.

## 2.3 Geeniekspression määrittäminen

Murskasin jäädytetyt kuningattaret yksitellen kuulamurskaimella (Tissue Lyser II (Qiagen)). Eristin murskeesta totaali-RNA:n RNeasy Micro Kitillä (Qiagen) valmistajan ohjeiden mukaan ja tarkistin RNA:n konsentraation NanoDrop –spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific) (vaihteluväli 400–650 µg/µl). Eristetystä RNA:sta käänsin DyNAmo cDNA synthesis –kitillä (Thermo Fisher Scientific) valmistajan ohjeiden mukaan cDNA:ta. Komplementaarisen DNA eli cDNA:n valmistus perustuu siihen, että käänteis-transkriptaasi tunnistaa totaali-RNA:n joukosta lähetti-RNA:n eli mRNA:n sen poly-A-hännän perusteella ja syntetisoi siitä kaksijuosteisen DNA:n. Komplementaarinen DNA on siis mRNA:n kopio, joka ei ole yhtä altis hajoamiselle kuin epävakaata RNA.

Kvantitatiivinen PCR (jatkossa qPCR) on PCR-menetelmä, jossa mitataan tuotteen muodostusta jokaisen PCR-syklin aikana reaaliaikaisesti. Menetelmä perustuu fluoresoivaan

reportteriyhdisteeseen, joka liittyy DNA-molekyyliin synteessin aikana. Reportteriyhdiste tuottaa signaalia, jonka määrä on suoraan verrannollinen PCR-tuotteen määrään. SYBR Green -reportteriyhdistettä käytettäessä fluoresoiva leima sitoutuu uuteen kaksijuosteiseen DNA-molekyyliin. Mitä enemmän tuotetta monistuu, sitä aikaisemmassa PCR-syklissä (Cycle threshold, Ct-arvo) SYBR Green -signaalia havainnoidaan ja sitä enemmän alkuperäisessä näytteessä on ollut DNA:ta. Tulosten luotettavuuden kannalta on suositeltavaa myös käyttää teknisiä replikaatteja (yleensä min. 3 per näyte), jotta nähdään että tulokset ovat mahdollisimman toistettavia ja luotettavia (Bustin ym. 2009).

Kun qPCR:n templaattina käytetään mRNA:sta käännettyä cDNA:ta (Reverse Transcriptase-qPCR, RT-qPCR) voidaan tutkia miten geenit aktivoituvat eri tilanteissa. Menetelmän haittapuolena on se, että jo hyvin pienet muutokset näytteessä, sen käsittelyssä tai reaktion olosuhteissa vaikuttavat tuloksiin huomattavasti. Koska SYBR Green sitoutuu mihin tahansa DNA:han on ensiarvoisen tärkeää, että cDNA:n templaattina käytettävä mRNA on mahdollisimman puhdasta. Standardointiin on kuitenkin kehitetty erilaisia keinoja, kuten tässä tutkimuksessa käyttämäni sisäisenä kontrollina toimiva perusaineenvaihduntageeni, jonka ekspressiotason pitäisi olla vakio olosuhteista riippumatta (Scharlaken ym. 2008).

Aikaisempien tutkimusten (Ratzka ym. 2011) ja argentiinanmuurahaisen sekvensoidun genomien perusteella (Smith ym. 2011) valitsin tutkimukseeni kahdeksan kandidaattia tutkittavaksi immuunigeeneiksi ja neljä kandidaattia perusaineenvaihduntageenejä sisäisiksi standardeiksi (taulukot 2 ja 3).

**Taulukko 2.** Testatut ja tutkimukseen valitut immuunigeenit (Viljakainen 2015). Lopulliseen tutkimukseen valitut geenit merkitty tähdellä.

Geeni	Lyhenne	Kuvaus
<i>Defensin</i>	<i>def</i>	antimikrobiaalinen peptidi
<i>Gram Negative Binding Protein 1-1*</i>	<i>GNBP1-1</i>	tunnistaa gram-positiivisia bakteereja, aktivoi Toll-signalointireittiä
<i>Gram Negative Binding Protein 1-2</i>	<i>GNBP1-2</i>	tunnistaa gram-positiivisia bakteereja, aktivoi Toll-signalointireittiä
<i>Hymenoptaecin*</i>	<i>hym</i>	antimikrobiaalinen peptidi, estää bakteerien kasvua
<i>Peptidoglycan Recognition Protein LC*</i>	<i>PGRP-LC</i>	tunnistaa gram-negatiivisia bakteereja. Transmembraaninen reseptori, aktivoi IMD-signaalireittiä
<i>Peptidoglycan Recognition Protein SA</i>	<i>PGRP-SA</i>	tunnistaa gram-positiivisia bakteereja, aktivoi Toll-signalointireittiä
<i>Prophenoloxidase</i>	<i>PPO</i>	katalysoi melaniinin tuottoa infektiokohdissa
<i>Thioester-containing protein 3*</i>	<i>TepIII</i>	toimii opsoniinina ja valmistelee mikrobeja fagosytoosiin

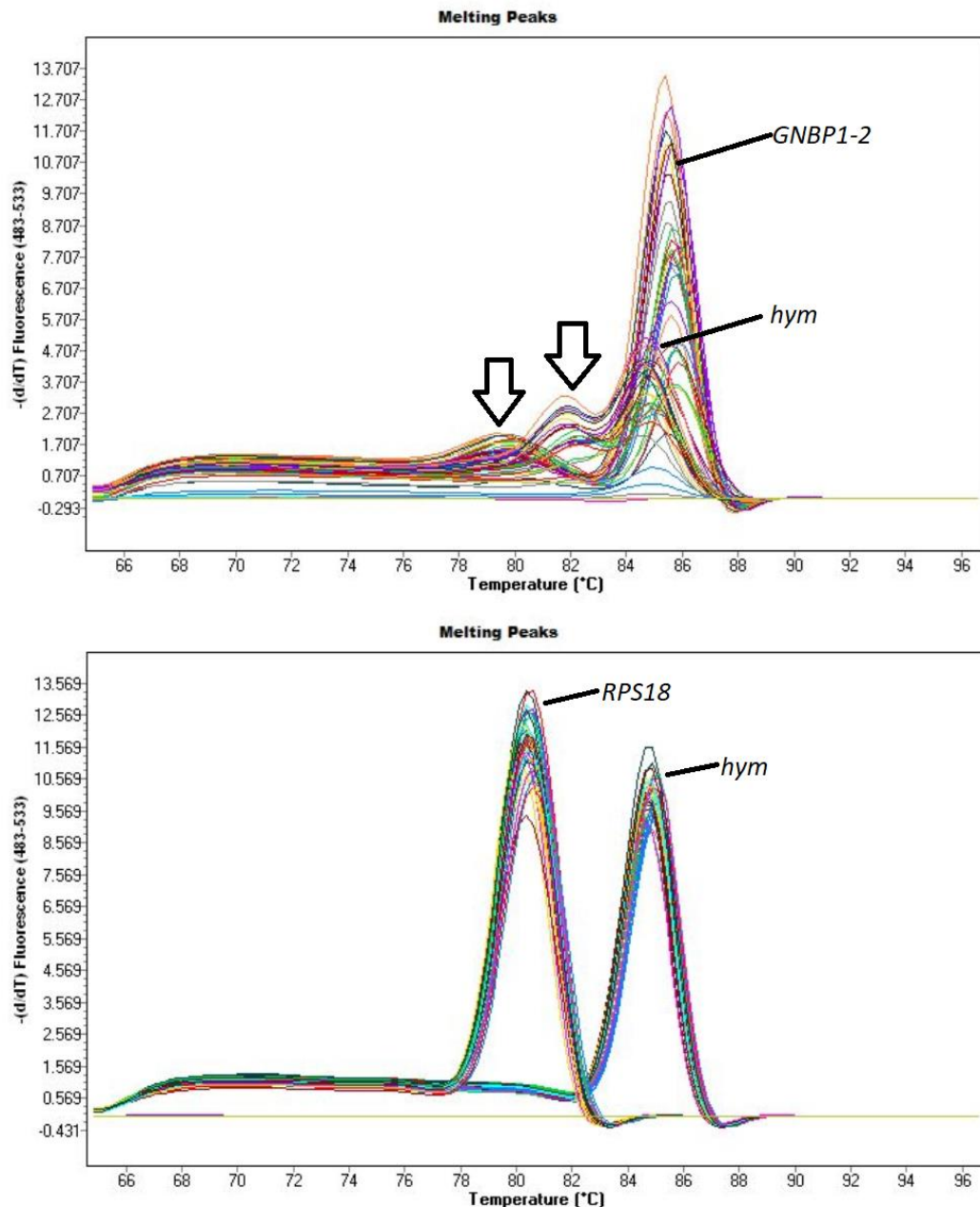
**Taulukko 3.** Testatut ja tutkimukseen valitut perusaineenvaihduntageenit (Scharlaken ym. 2008). Lopulliseen tutkimukseen valittu geeni merkitty tähdellä.

Geeni	Lyhenne	Kuvaus
<i>Actin</i>	<i>actin</i>	Aktiinin tuotto
<i>Ribosomal Protein S18*</i>	<i>RPS18</i>	koodaa 40S ribosomin komponenttiproteiinia
<i>Arginine Kinase</i>	<i>AK</i>	Koodaa arginiinikinaasia
<i>Elongation Factor-1 alpha</i>	<i>EF-1a</i>	proteiinisynteesi, aminohappoketjun pidentäminen

Ennen varsinaista tutkimusta optimoin ja testasin geenien soveltuvuutta tutkimukseen sekä qPCR-olosuhteita lämpötilan ja alukekonsentraatioiden suhteen lukuisilla koeajoilla. Pyrin optimoimaan prosessia alukkeiden liittyämisvaiheen lämpötilan (59–**61°C**) ja alukekonsentraatioiden suhteen (F-aluke **1**–3  $\mu$ M, R-aluke **1**–3  $\mu$ M), niin että kukin valittava geeni antaisi mahdollisimman selkeän ja säännönmukaisen signaalin (Nolan ym. 2006). Alleviivattuna ja vahvistettuna lopulliseen tutkimukseen valitsemani konsentraatiot ja



lämpötila. Erityisen tärkeää oli eliminoida väärää signaalia antavat toisiinsa tarttuvat alukeparit eli niin sanotut alukedimeerit (kuva 3). Tein myös kullekin geenille standardisuorat, joiden avulla laskettiin PCR-reaktion tehokkuus. Lisäksi arvioin standardeina toimivien perusaineenvaihduntageenien soveltuvuutta R-ohjelmiston (R Core Team 2014) NormFinder-paketilla (Andersen ym. 2004). Alukkeiden ja qPCR-prosessin optimoinnin tuloksena valitsin lopulliseen tutkimukseen 4 immuunigeeniä (*GNBP1-1*, *PGRP-LC*, *hym*, *TepIII*) ja NormFinderin vertailussa parhaaksi havaitun perusaineenvaihduntageenin (*RPS18*).



**Kuva 3.** Esimerkki qPCR-prosessin optimointivaiheen ja varsinaisen tutkimuksen PCR-tuotteiden sulamiskäyristä. Ylemmässä kuvassa *GNBP1-2*- ja *hym*-immuunigeenien sulamiskäyriä eri alukekonsentraatioille, haitalliset alukedimeerit merkitty nuolilla. Alemmassa kuva varsinaisen tutkimuksen *hym*-immuunigeenin ja *RPS18*-perusaineenvaihduntageenin käyrät, joissa ei ole havaittavissa alukedimeereja.

Varsinaista tutkimusta varten valmistelin LightCycler 480-PCR-laitteen (Roche Life Science) qPCR-levyt niin, että joka levyllä oli jokaisen kuningattaren cDNA-näyte kolmena teknisenä replikaattina sekä tutkittavalle immuunigeenille että perusaineenvaihduntageenille, yhteensä siis 72 kaivoa (taulukko 4). Ajoin qPCR-ohjelman (taulukko 5) ja kirjasin kunkin geeniyhdistelmän kynnysarvot ( $C_t$ ) ja PCR-tehokkuuden (E) ylös tilastollisia analyysyjä varten.

**Taulukko 4.** Kuningattarien qPCR-levyn kuvaus. Lyhenteet kuvaavat kuningattarien tunnistetta. B/K = Bakteripistos / Kontrollipistos, s/y = sosiaalisesti / yksin, 1/2/3 = biologisen replikaatin numero, k = kuningatar. Esim. Bs1k = Bakteripistoksella pistetty sosiaalinen kuningatar nro 1. NTC = Non-Template Control, ei sisällä cDNA-templaattia.

( $T_a$  61 °C) (cDNA (1:50), 10 h kuningattarien patogeenisuuden jälkeen)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Bs1k	Bs1k	Bs1k	Bs2k	Bs2k	Bs2k	Bs3k	Bs3k	Bs3k		NTC		Immuunigeeni rivit A-D
B	By1k	By1k	By1k	By2k	By2k	By2k	By3k	By3k	By3k		NTC		
C	Ks1k	Ks1k	Ks1k	Ks2k	Ks2k	Ks2k	Ks3k	Ks3k	Ks3k		NTC		
D	Ky1k	Ky1k	Ky1k	Ky2k	Ky2k	Ky2k	Ky3k	Ky3k	Ky3k				
E	Bs1k	Bs1k	Bs1k	Bs2k	Bs2k	Bs2k	Bs3k	Bs3k	Bs3k		NTC		Kontrolligeeni RPS18 rivit E-H
F	By1k	By1k	By1k	By2k	By2k	By2k	By3k	By3k	By3k		NTC		
G	Ks1k	Ks1k	Ks1k	Ks2k	Ks2k	Ks2k	Ks3k	Ks3k	Ks3k		NTC		
H	Ky1k	Ky1k	Ky1k	Ky2k	Ky2k	Ky2k	Ky3k	Ky3k	Ky3k				

**Taulukko 5.** Varsinaisessa tutkimuksessa käytetty PCR-ohjelma.

	Lämpötila	Aika	Toistot
Alkudenaturaatio	95 °C	300 s	x 1
Denaturaatio	95 °C	10 s	x 45
Alukkeiden kiinnitys	61 °C	20 s	
Pidennys	72 °C	10 s	

Alun perin tarkoitukseni oli lisäksi toteuttaa vastaavat koejärjestelyt myös kuningattaren kanssa 10 h viettäneillä työläismuurahaisilla (poolattuna, 5 työläistä per käsittely-yhdistelmä) nähdäkseni oliko kuningattaren kokema patogeenialtistus aktivoinut niidenkin immuunigeenejä. Mittaukset NanoDrop-spektrofotometrillä antoivat kuitenkin kaikille työläispooleille paljon kuningattaria alhaisempia RNA-pitoisuuksia (alle 10 µg/µl). Jatkoin kuitenkin tutkimusta myös työläisnäytteillä ja ajoin niistä saaduilla cDNA:illa qPCR:n niin, että joka levyllä oli 2+1 geeniä (taulukko 6). Ajon tuloksista oli nähtävissä, että suurimmassa osassa kaivoista ei ollut monistunut mitään tai korkeintaan niin vähäisiä määriä PCR-tuotetta, ettei sen perusteella pystyisi sanomaan mitään. Tästä syystä päätin jättää työläisdatan pois tilastollisista analyyseistä.

**Taulukko 6.** Työläisten RT-qPCR-levyn kuvaus. Lyhenteet kuvaavat työläispoolien tunnistetta. B/K = Bakteripistos / Kontrollipistos, s = sosiaalisesti, 1/2/3 = biologisen replikaatin numero, t = työläiset. Esim. Bs1t = Bakteripistoksella pistetyn kuningattaren nro 1 kanssa sosiaalisesti ollut työläispooli. NTC = Non-Template Control, ei sisällä cDNA-templaattia.

(T<sub>a</sub> 61 °C) (cDNA (1:50), 10 h kuningattarien patogeenialtistuksen jälkeen)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bs1t	Bs1t	Bs1t	Bs2t	Bs2t	Bs2t	Bs3t	Bs3t	Bs3t	NTC	NTC	NTC
B	Ks1t	Ks1t	Ks1t	Ks2t	Ks2t	Ks2t	Ks3t	Ks3t	Ks3t			
C	Bs1t	Bs1t	Bs1t	Bs2t	Bs2t	Bs2t	Bs3t	Bs3t	Bs3t	NTC	NTC	NTC
D	Ks1t	Ks1t	Ks1t	Ks2t	Ks2t	Ks2t	Ks3t	Ks3t	Ks3t			
E	Bs1t	Bs1t	Bs1t	Bs2t	Bs2t	Bs2t	Bs3t	Bs3t	Bs3t	NTC	NTC	NTC
F	Ks1t	Ks1t	Ks1t	Ks2t	Ks2t	Ks2t	Ks3t	Ks3t	Ks3t			
G												
H												

Immuunigeeni 1  
rivit A-B

Immuunigeeni 2  
rivit C-D

Kontrolligeeni  
RPS18 rivit E-F

Lopuksi varmistin vielä qPCR-reaktioiden onnistumisen sekä oikean bakteerin käytön sekvensoimalla qPCR tuotteet ja *S. marcescens*-bakteerinäyte BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitillä (Applied Biosystems) valmistajan ohjeiden mukaan 3730 DNA Analyzer-sekvensointilaitteella (Applied Biosystems) (Wang ym. 2009). Sekvensointitulosten perusteella etsin BLAST-algoritmillä (Altschul ym. 1990) Nucleotide BLAST-haulla Nucleotide collection (nr/nt) –tietokannasta vastaavia sekvenssejä (Madden 2005).

## 2.4 Tilastolliset analyysit

RT-qPCR-reaktion kynnysarvojen (cycle threshold,  $C_t$ ) ja PCR-tehokkuuden ( $E$ ) perusteella laskin jokaiselle geeniyhdistelmälle suhteellisen ekspressiotason (relex,  $r_E$ ) kaavalla, joka pohjautuu Erlerin (Erler ym. 2011) esittämään kaavaan yhdelle perusaineenvaihduntageenille sovellettuna (kaava 1).

$$r_E = \frac{E_{(RPS18)}^{C_t(RPS18)}}{E_{(Immuunigeeni)}^{C_t(Immuunigeeni)}}$$

$C_t$  = Kynnysarvo  
 $E$  = PCR tehokkuus  
 $r_E$  = suhteellinen ekspressio

**Kaava 1.** Suhteellisen ekspressiotason ( $r_E$ ) laskukaava.

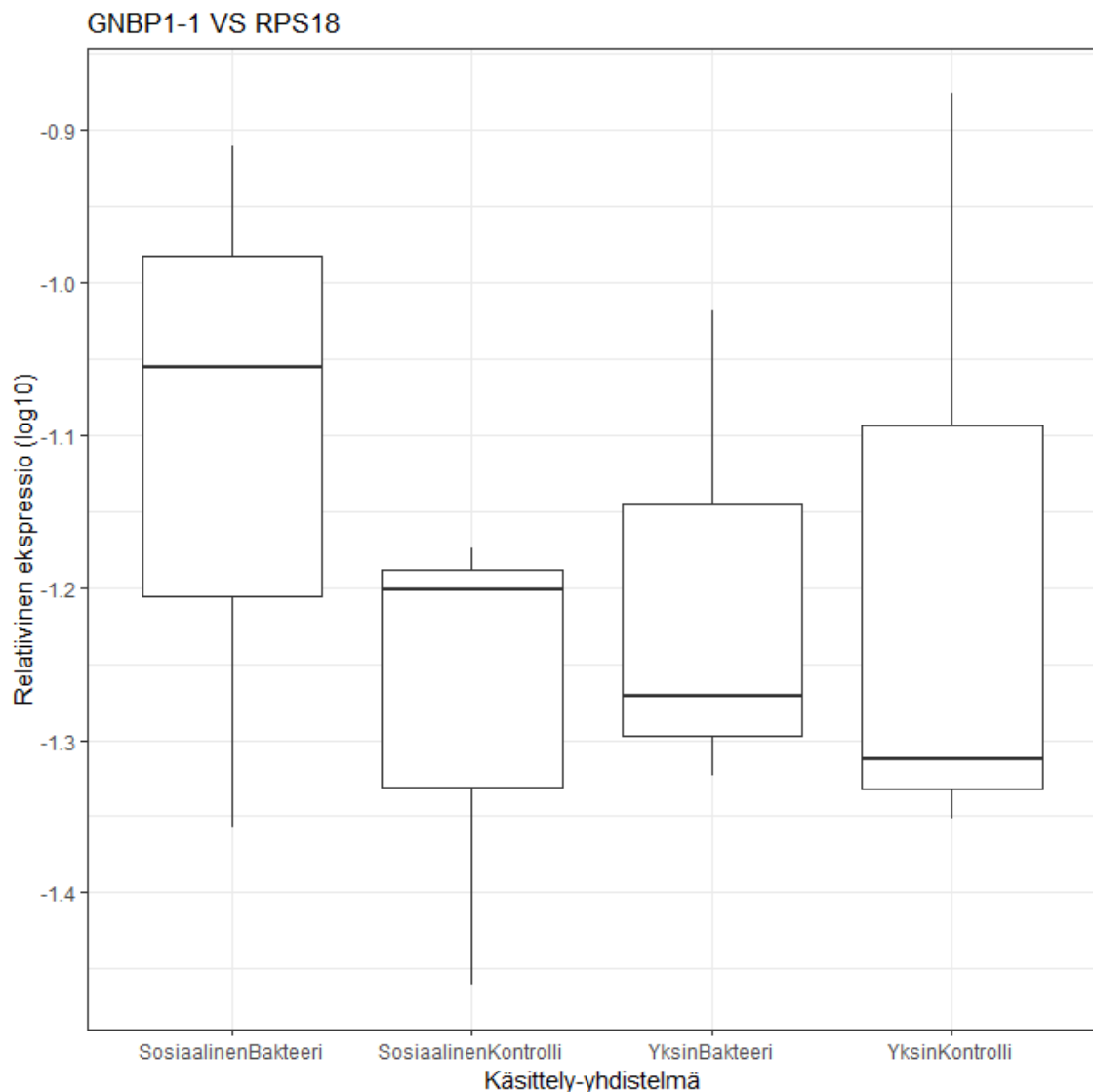
Tein R-ohjelmistolla (R Core Team, 2014) kunkin geeniyhdistelmän relex-arvoilla esitetit (Shapiro-Wilkin testi normaalijakautuneisuudesta ja Levenen testi varianssien yhtäsuuruudesta) datan soveltuvuuden ja normalisuuden varmistamiseksi. Esitestien tulosten perusteella tein kaksisuuntaisen varianssianalyysin ANOVAn (analysis of variance) logaritmisoiduilla ( $\log_{10}$ ) relex-arvoilla (taulukot 7–10) (Erler ym. 2011). ANOVAn perusteella arvioin, oliko käsittelyillä tai niiden yhdistelmällä tilastollisesti merkittävää vaikutusta immuunigeenien ekspressioon vai ei. Lisäksi piirsin R-ohjelmistolla ggplot2-paketilla (Wickham 2016) laatikko-jana-kuvaajat tulosten visualisoimiseksi logaritmoiduilla ( $\log_{10}$ ) relex-arvoilla (kuvat 3–6).

### 3 Tulokset

#### 3.1 Immuunigeenien suhteellinen ekspressiotaso eri käsittelyillä

##### 3.1.1 *Gram Negative Binding Protein 1-1*

Argentiinanmuurahaiskuningattarien *GNBP1-1*-geenin suhteellinen ekspressiotaso ei tilastollisesti merkittävästi riippunut patogeenialtistuksesta (pistos) tai sosiaalisuuskäsittelystä (kuva 4, taulukko 7). Käsittelyillä ei myöskään havaittu tilastollisesti merkittävää yhdysvaikutusta (Pistos : Sosiaalisuus), joka olisi kertonut geenin immuunivasteen olevan eri suuruinen yksin ja viiden työläisen kanssa 10 h olleilla kuningattarilla.



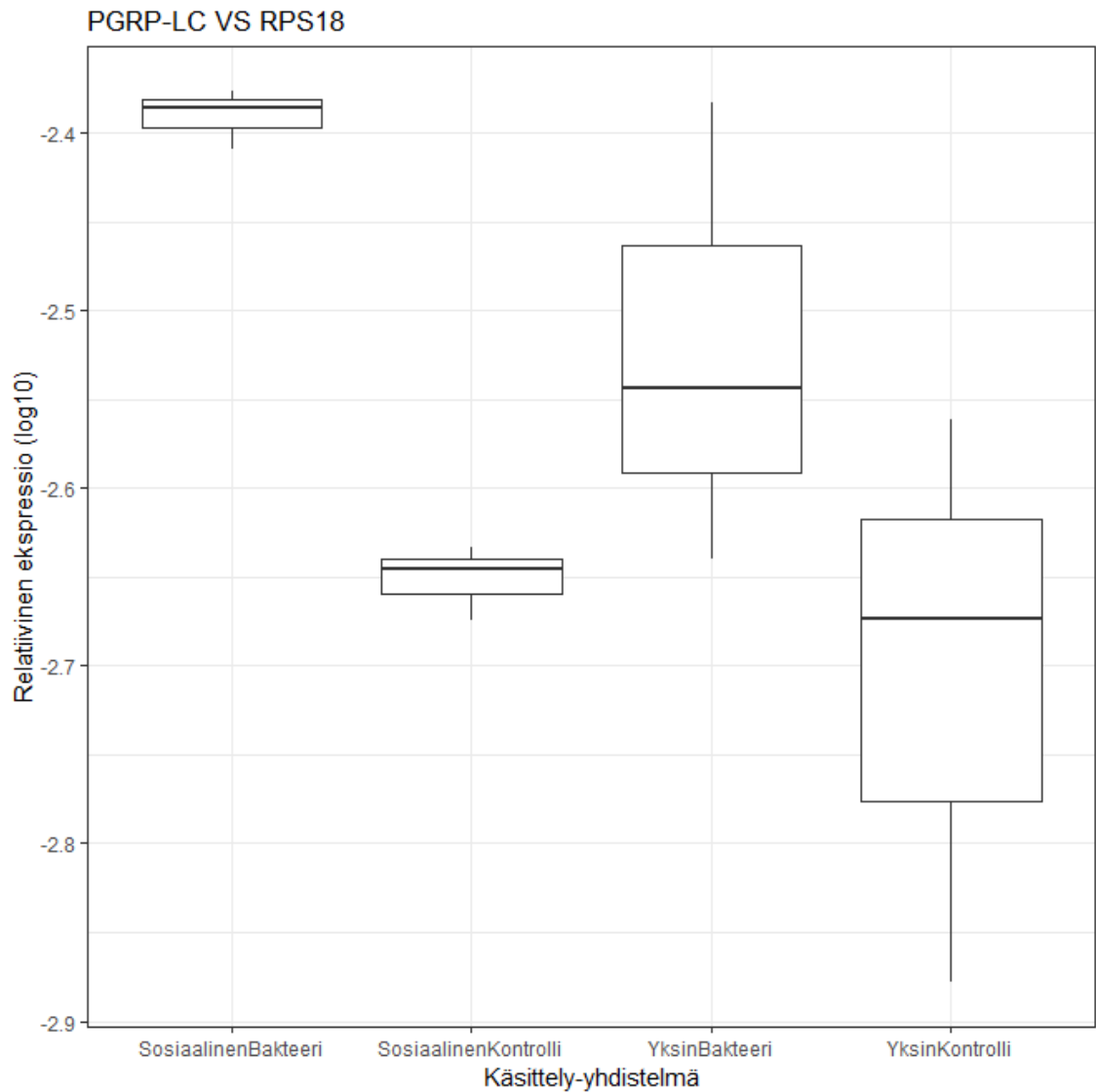
**Kuva 4.** Laatikko-jana-kuvaaja *GNBP1-1*-geenin suhteellisesta ekspressiosta kullekin käsittely-yhdistelmälle logaritmoiduille (log10) relex-arvoille.

**Taulukko 7.** *GNBP1-1*-geenin ANOVA-tulokset logaritmoiduille (log10) relex-arvoille. Df = vapausaste, SS = neliösumma, MS = keskiarvojen neliö, F = F-testiluku, p = p-arvo.

	<b>Df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Pistos</b>	1	0,0161	0,01612	0,373	0,558
<b>Sosiaalisuus</b>	1	0	0	0	0,993
<b>Pistos : Sosiaalisuus</b>	1	0,0287	0,02872	0,664	0,439
<b>residuaalit</b>	8	0,3459	0,04324		

### 3.1.2 *Peptidoglycan Recognition Protein LC*

Argentiinanmuurahaiskuningattarien *PGRP-LC*-geenin suhteellinen ekspressiotaso oli selvästi korkeampi kuningattarille, jotka olivat kokeneet patogeenialtistuksen (pistos) kuin niillä, joita oli pistetty kontrolliliuksella (kuva 5, taulukko 8). Sosiaalisuuskäsittelyllä tai käsittelyiden yhdysvaikutuksella (Pistos : Sosiaalisuus) ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkittävää vaikutusta geenin suhteelliseen ekspressiotasoon yksin ja viiden työläisen kanssa 10 h olleilla kuningattarilla.



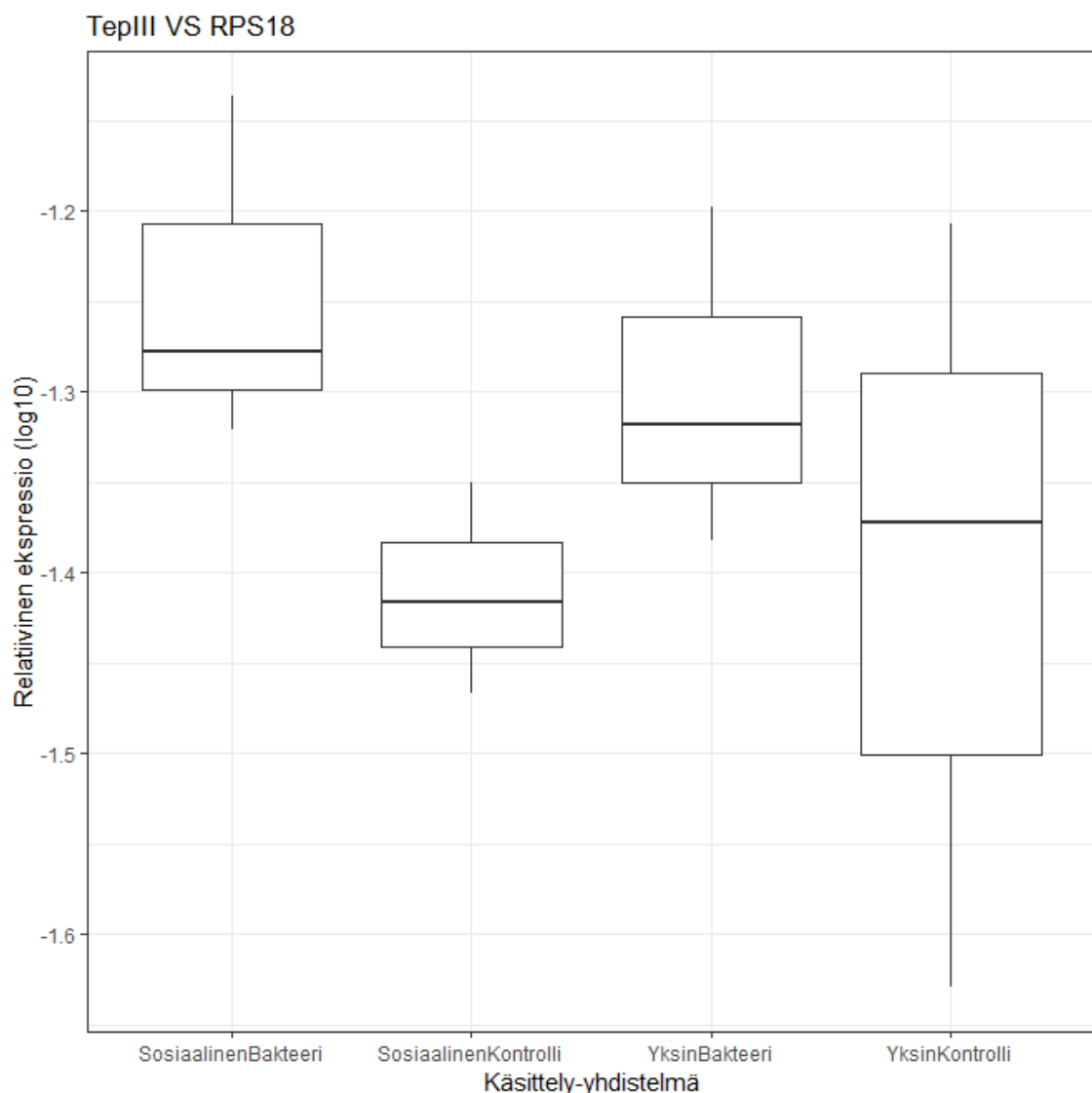
**Kuva 5.** Laatikko-jana-kuvaaja *PGRP-LC*-geenin suhteellisesta ekspressiosta kullekin käsittely-yhdistelmälle logaritmoiduille (log10) relex-arvoille.

**Taulukko 8.** *PGRP-LC*-geenin ANOVA-tulokset logaritmoiduille (log10) relex-arvoille. Tilastollisesti merkittävät p-arvot merkitty tähdellä (\*). Df = vapausaste, SS = neliösumma, MS = keskiarvojen neliö, F = F-testiluku, p = p-arvo.

	Df	SS	MS	F	p
<b>Pistos</b>	1	0,14727	0,14727	13,598	0,00615**
<b>Sosiaalisuus</b>	1	0,02573	0,02573	2,376	0,1618
<b>Pistos : Sosiaalisuus</b>	1	0,00461	0,00461	0,426	0,53227
<b>residuaalit</b>	8	0,08664	0,01083		

### 3.1.3 Thioester-containing protein 3

Argentiinanmuurahaiskuningattarien *TepIII*-geenin suhteellinen ekspressiotaso ei tilastollisesti merkittävästi riippunut patogeenialtistuksesta (pistos) tai sosiaalisuuskäsittelystä (kuva 6, taulukko 9), vaikka patogeenialtistuksen kokeneille kuningattarilla olikin jonkin verran korkeampi geenin ekspressiotaso. Käsittelyillä ei myöskään havaittu tilastollisesti merkittävää yhdysvaikutusta (Pistos : Sosiaalisuus), joka olisi kertonut geenin immuunivasteen olevan eri suuruinen yksin ja viiden työläisen kanssa 10 h olleilla kuningattarilla.



**Kuva 6.** Laatikko-jana-kuvaaja *TepIII*-geenin suhteellisesta ekspressiosta kullekin käsittely-yhdistelmälle logaritmoiduille (log10) relex-arvoille.

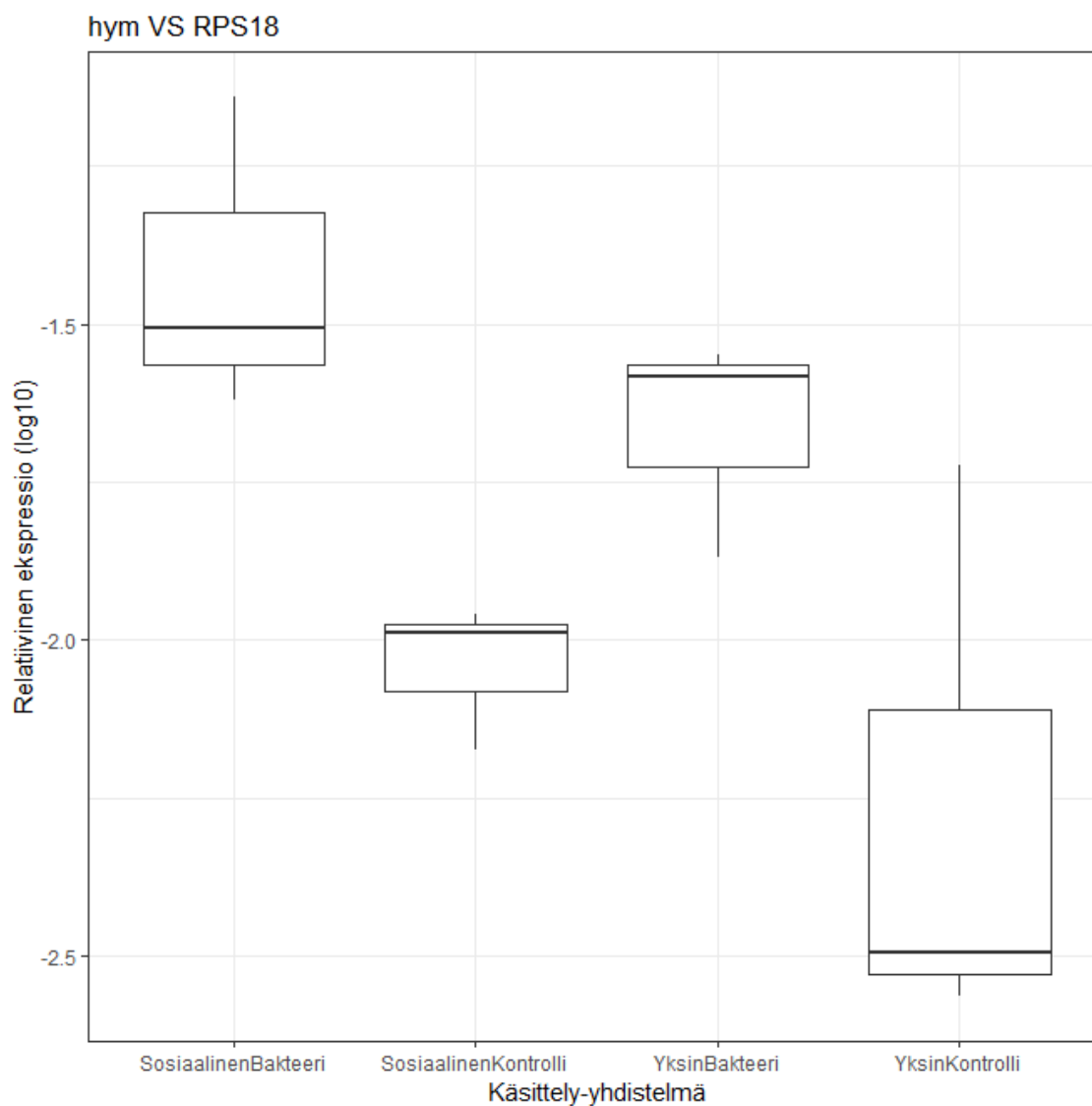


**Taulukko 9.** *TepIII*-geenin ANOVA-tulokset logaritmoiduille (log10) relex-arvoille. Df = vapausaste, SS = neliösumma, MS = keskiarvojen neliö, F = F-testiluku, p = p-arvo.

	<b>Df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Pistos</b>	1	0,05446	0,05446	3,267	0,108
<b>Sosiaalisuus</b>	1	0,00165	0,00165	0,099	0,761
<b>Pistos : Sosiaalisuus</b>	1	0,00292	0,00292	0,175	0,686
<b>residuaalit</b>	8	0,13334	0,01667		

### 3.1.4 *Hymenoptaecin*

Argentiinanmuurahaiskuningattarien *hym*-geenin suhteellinen ekspressiotaso oli selvästi korkeampi kuningattarille, jotka olivat kokeneet patogeenialtistuksen (pistos) kuin niillä, joita oli pistetty kontrolliliuoksella (kuva 7, taulukko 10). Sosiaalisuuskäsittelyllä tai käsittelyiden yhdysvaikutuksella (Pistos : Sosiaalisuus) ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkittävää vaikutusta geenin suhteelliseen ekspressiotasoon yksin ja viiden työläisen kanssa 10 h olleilla kuningattarilla.



**Kuva 7.** Laatikko-jana-kuvaaja *hym*-geenin suhteellisesta ekspressiosta kullekin käsittely-yhdistelmälle logaritmoiduille (log10) relex-arvoille.

**Taulukko 10.** *hym*-geenin ANOVA-tulokset logaritmoiduille (log10) relex-arvoille. Tilastollisesti merkittävät p-arvot merkitty tähdellä. Df = vapausaste, SS = neliösumma, MS = keskiarvojen neliö, F = F-testiluku, p = p-arvo.

	Df	SS	MS	F	p
<b>Pistos</b>	1	1,1024	1,1024	13,575	0,00618**
<b>Sosiaalisuus</b>	1	0,1613	0,1613	1,987	0,19635
<b>Pistos : Sosiaalisuus</b>	1	0,0004	0,0004	0,005	0,9436
<b>residuaalit</b>	8	0,6496	0,0812		

### 3.2 Sekvensoinnin tulokset

Tutkimusgeenien ja *S. marcescens*-bakteerinäytteen sekvensointi onnistui vain osittain, sillä vain *RPS18*-, *GNBP1-I*- ja *TepIII*-geenien sekvenssit saatiin selvitettyä. Sekvenssien perusteella löydettiin Nucleotide collection (nr/nt) –tietokannasta vastaavia sekvenssejä (taulukko 11). Onnistuneet sekvensointitulokset vastasivat niitä geenejä, joita niiden pitikin.

**Taulukko 11.** Tarkistussekvensoinnin tulokset. Geenin sekvenssi sekä sen perusteella tehdyn Nucleotide BLAST tietokantahaun tulokset.

Geeni	Sekvenssi	Nucleotide BLAST
<i>RPS18</i>	AAAAGATATTGTTGATGGAAAATACTCGCAGCTC ACGAGTGCCAATTTGGACTCTAAGTTGCGTGAGGA T	PREDICTED: Linepithema humile 40S ribosomal protein S18 (LOC105669856), mRNA
<i>GNBP1-I</i>	GCGTAAAGATAAACTTCAAGATACATGGTCGAGT GATTCTGACACGACAAAAGCTCCGTTTGATCAAGA GTTCTATATCACGCTCGGTGTCGGTGTGGGCGGAG TGCGCACGTTTCCGGATAACACGATGAGTTCTGGA TGGGCAAAACCATGGAAAAACCGGGGTGCTAAGG CAATGCTAAATTTCTGGAACTCGCGGAATCAATGG CTACCAAGCTGGGAGAATCGTGACAAGACTGCTTT TGTAATAGATTACGTTC	PREDICTED: Linepithema humile beta-1,3-glucan- binding protein-like (LOC105673881), mRNA
<i>TepIII</i>	ATGGAAGTCAGCCTACCATCTGGCTTTACAGTGGA CAGAGATTCTCTACCGAGTCTAGAAATATCATCGC ATGTAAAACGTGTGGAACTAAAGAGGGTGACAC AATGGTGGTTTTATATTTGACAAGATGGTGAAGC AAGAGTATTGTCCAACGTGTATCC	PREDICTED: Linepithema humile CD109 antigen-like (LOC105680006), mRNA

## 4 Pohdinta

Sosiaalinen immuniteetti on emergentti ominaisuus, joka suojaa sosiaalisia eliöitä sosiaalisissa yhteisöissä elämisen haitallisilta puolilta, eli tässä tapauksessa tiiviimpien elinympäristöjen ja geneettisen homogeenisuuden mahdollistamalta suuremmalta patogeenipaineelta. Ensiarvoisen tärkeää se on muurahaisten kaltaisille aitososiaalisilla hyönteisille, joiden geneettinen samankaltaisuus ja sisäsiittoisuus voivat olla hyvin korkeita, varsinkin monogyynisillä lajeilla. Teoriassa jokin paha taudinaiheuttaja voisi levitä kulovalkean tavoin ja tuhota koko kolonian.

Tämä pätee etenkin argentiinanmuurahaisille, joiden ihmisen mukana maailmalle Etelä-Amerikasta levinneet massiiviset superkoloniat ovat pullonkaulavaikutuksen vuoksi huomattavasti Etelä-Amerikan natiivipopulaatioita geneettisesti homogeenisempiä (Suarez ym. 2008). Toisaalta tämä on saattanut olla niille myös kilpailuetu, sillä on havaittu, että invasiivisten populaatioiden pesien välillä on paljon vähemmän aggressiivisuutta ja sulatutuvat helpommin, minkä on esitetty osaltaan mahdollistaneen valtavien superkolonioiden muodostumisen (Tsutsui ym. 2000, Vásquez & Silverman 2008).

On esitetty, että aitososiaaliset eliöt painottaisivat sosiaalista immuniteettia jopa oman selviytymisensä kustannuksella. Täten ne siis vähentäisivät omaa yksilöllistä immuunivastettaan sosiaalisissa tilanteissa, sillä olisi kannattavampaa panostaa sosiaaliseen puolustukseen (Simone ym. 2009, Chapuisat ym. 2007). Pro gradu –tutkielmassani tutkin tätä transkriptomitasolla tarkastelemalla argentiinanmuurahaiskuningattarien neljän immuunigeenin aktivaatiota vasteena patogeenialtistukselle (*S. marcescens*) riippuen siitä olivatko ne altistuksen jälkeen yksin vai sosiaalisessa ympäristössä viiden työläisen kanssa.

Tulosten perusteella nähtiin, että sosiaalisuudella ei ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta kuningattarien immuunivasteen aktivaatioon. Bakteeriliuokseen kastetulla neulalla pistetyillä kuningattarilla nähtiin kontrolliryhmää korkeampaa immuunigeenien aktivaatiota, etenkin *PGRP-LC*-geenillä (koodaa gram-negatiivisia bakteereja tunnistavaa reseptoria) ja *hym*-geenillä (estää bakteerien kasvua), mikä oli odotettavissakin. Kuningattarien sosiaalinen eristäminen tai sosiaalisesti viiden työläisen kanssa ole ei kuitenkaan näyttänyt merkittävästi vaikuttavan immuunivasteen tasoon. Tältä osin voidaan siis sanoa, että tulokset eivät tukeneet tutkimushypoteesia, jonka mukaan immuunivasteen olisi pitänyt olla pienempi työläisten kanssa kymmenen tuntia viettäneillä kuningattarilla.

Ennakko-oletuksista poiketen näyttäisi siis siltä, että sosiaalisuus ei merkittävästi alenna immuunigeenien aktivaatiota. Laajemmalla argentiinanmuurahaisten transkriptomitutkimuksessa (Viljakainen ym. 2018) ei myöskään havaittu odotettua immuunivasteen alenemista sosiaalisuuden seurauksena, vaikka immuunigeenien ekspressiotasot muuttuivatkin riippuen siitä, olivatko kuningattaret eristettyinä vai eivät. Laajemmalla tasolla näyttäisikin siltä, että sosiaalinen immunitetti ei niinkään korvaa yksilötason immuunipuolustusta, vaan täydentää ja vahvistaa sitä. Sosiaalisen immunitetin kustannuksia yksilötasolla on myös ehkä jossain määrin liioiteltu, sillä monet sen muodot eivät muodosta suurta taakkaa. Esimerkiksi yleisimmän sosiaalista immunitettia edistävän käytöksen eli toisten yhteisön jäsenten sukumisen on havaittua aktivoivan myös yksilön omaa immuunivastetta (Theis ym. 2015).

Yleisesti on lisäksi ajateltu, että aitososiaalisten hyönteisten vähäisempi määrä immuunigeenien kopioita genomissa olisi seurausta aitososiaalisuuden kehittymisestä, mutta tämä ei ilmeisesti pidä paikkaansa (Sackton 2019). Vertailemalla sosiaalisten ja yksinelävien mehiläisten immuunien geenien kopiomäärää havaittiin ne hyvin samankaltaisiksi, minkä perusteella näyttäisi siltä, ettei kopiomäärän vähäisyys liity sosiaalisuuteen (Barribeau ym. 2015). Ylipäätään monissa sosiaalisten hyönteisten immuunipuolustusta tutkivissa tutkimuksissa on keskitytty lähinnä vertailemaan niitä genomitasolla *Drosophila* -suvun kärpäsiin ja jätetty huomiotta muut immuunisysteemeille tärkeät komponentit kuten suoliston symbioottinen mikrobifauna (Otani ym. 2016). Lisäksi on havaittu, että sosiaalisilla eliöillä jo sosiaalinen eristäminen itsessään (Kohlmeier ym. 2016) sekä muutokset ympäristössä (Stucki ym. 2017) lisäävät yksilöiden kokemaa stressiä immuunivastetta alentavasti ja vaikuttavat niiden käyttäytymiseen ja fysiologiseen tilaan negatiivisesti (Adamo 2017, Koto ym. 2015), mitkä kaikki lisäävät kuolleisuutta. Aitososiaalisilla hyönteisillä kuten muurahaisilla eristämisen negatiivisten vaikutusten voisi olettaa olevan vieläkin voimakkaampia.

Viime aikoina on myös alettu kyseenalaistaa yleisenä paradigmana pidettyä ns. aitososiaalista viitekehystä, jonka mukaan sosiaaliseen immunitetin kaltaiset aitososiaalisille eliöille tyypillisinä pidetyt yhdyskuntason emergentit ominaisuudet olisivat tiukasti seurausta aitososiaalisuuden kehittymisestä. Sosiaalista immunitettia laajemmalla kontekstissa tarkasteleva ns. ryhmäelämisen viitekehys (Van Meyel ym. 2018) esittää, että sosiaalinen immunitetti eri muodoissaan on ollut elintärkeää sosiaalisuuden kehittymiselle ja näin ollen siis ollut pikemminkin edellytys aitososiaalisuudelle kuin sen ominaisuus (Nuotclà ym. 2019).

Toki aitososiaalisten hyönteisten kohtaama huomattavasti suurempi patogeenipaine myös on lisännyt niiden immuunisopeumien evolutiivista painetta (Viljakainen ym. 2009).

Mahdollisissa jatkotutkimuksissa tulisi lisätä näytemäärää eli siis patogeenille altistettavien kuningattarien määrää (biologisia replikaatteja per käsittely) luotettavamman ja robustimman tilastollisen analyysin tekemiseksi. Tämä lisäisi datan luotettavuutta ja kompensoisi mahdollisia virhelähteitä ja outliereita. Olisi myös syytä vertailla eri työläismäärien vaikutusta tuloksiin, jotta voitaisiin selvittää, paljonko työläisiä tarvitaan luomaan ”sosiaalinen ympäristö”. Aikasarjan tekeminen mahdollistaisi ekspressiotasojen muutosten havaitsemisen dynaamisemmin (Bar-Joseph 2012). Lisäksi olisi hyvä ottaa vielä yhdeksi kontrolliryhmäksi täysin pistämättömät kuningattaret ja verrata niitä patogeenille altistettuihin ja LB-kontrollikäsittelyn kokeneisiin, sillä jo kuningattarien haavoittaminen itsessään aiheuttaa paljon immuunigeenien aktivaatiota. Patogeenialtistus tulisi tehdä epätarkkojen hyönteisneulojen sijaan kvartsilasipipeteillä, jotta patogeenia voidaan annostella tarkemmin. Hyönteisneulaa käytettäessä haavakohdasta hypertension vuoksi ulos pullahtava hemolymfa huuhtoo helposti neulaa, mikä entisestään vaikeuttaa bakteerialtistuksen kontrollointia ja yhteneväisenä pitämistä. Kvantitatiivisia ekpressiotasoja mittaavan qPCR:n lisäksi olisi kannattavaa tehdä RNA-sekvensointi, jota on jo monissa tutkimuksissa käytettykin (Viljakainen ym. 2018, Sackton 2019) ja jolla voitaisiin saada paljon kattavampi kuva transkriptomista ja sen muutoksista patogeenialtistuksen seurauksena.

## 5 Yhteenveto

Tässä työssä tutkin sosiaalisen ympäristön vaikutusta kahdentoista argentiinanmuurahaiskuningattaren (*L. humile*) immuunigeenien ekspressioon patogeenialtistuksen (*S. marcescens*) jälkeen. Tutkimushypoteesini oli, että sosiaalisesti viiden työläisen kanssa altistuksen jälkeen olleilla kuningattarilla olisi alhaisempi immuunivaste kuin yksin eristyksissä olleilla kuningattarilla, mikä tukisi oletusta, jonka mukaan sosiaalinen immunitetti alentaisi yksilötason immuunivasteen aktivaatiota. Testasin tätä hypoteesia esitutkimusten perusteella valituilla neljällä immuunigeenillä (*GNBPI-1*, *PGRP-LC*, *hym*, *TepIII*) vertaamalla niiden kvantitatiivisella PCR:llä määritettyä ekspressiotasoa sisäisenä standardina toimivan perusaineenvaihduntageenin (*RPS18*) ekspressiotasoon. Näin laskettujen suhteellisten ekspressiotasojen (relex) perusteella tein tilastollisen analyysin (ANOVA), jonka perusteella arvioin eri käsittely-yhdistelmien vaikutusta.

Tulosten perusteella oli nähtävissä, että bakteeriliuokselle altistetuilla kuningattarilla oli selvästi tapahtunut immuunigeenien aktivaatiota verrattuna kontrolliliuokselle altistettuihin, etenkin *PGRP-LC*- ja *hym*-geeneillä, mikä oli odotettavissakin. Sosiaalisuudella sen sijaan ei havaittu tilastollisesti merkittävää vaikutusta minkään immuunigeenin ekspressioon. Tulosten perusteella sosiaalinen ympäristö ei siis alentanut argentiinanmuurahaiskuningattarien yksilötason immuunivastetta. Tätä tuki myös laajempi argentiinanmuurahaisilla tehty RNA-sekvensoinnilla toteutettu transkriptomitason tutkimus, jossa ei myöskään havaittu sosiaalisen ympäristön alentavan immuunigeenin aktivaatiota, vaikka transkriptomi olikin erilainen sosiaalisesti olleilla kuningattarilla.

Laajemmassa kontekstissa sosiaalisissa ryhmissä elämisen aiheuttama suurempi patogeenipaine ja genomitason sekä yhdyskuntason evolutiiviset sopeumat sekä näiden väliset vuorovaikutukset etenkin aitososiaalisilla eliöillä kuten muurahaisilla on hyvin mielenkiintoinen tutkimusaihe, jossa riittää vielä paljon selvittävää ja aihetta lisätutkimuksille.

## 6 Kiitokset

Haluan kiittää ohjaajaani Oulun yliopiston Ekologian ja genetiikan tutkimusyksikön dosentti Lumi Viljakaista arvokkaista neuvoista, kannustuksesta ja etenkin kärsivällisyydestä Pro gradu –tutkielmani ohjaamisessa. Lisäksi kiitän tohtori Emma Vatkaa, tulevia tohtoreita Konsta Haposta ja Perttu Anttosta sekä kaikkia muitakin, jotka ovat lopputyötäni kommentoineet, opastaneet ja auttaneet sen loppuunsaattamisessa. Kiitokset perheelleni ja ystäväilleni henkisestä tuesta, joka auttoi ottamaan niskalenkin lopputyöstä.

Erityiskiitokset Pro gradu –tutkielmani apurahojen myöntäjille Suomen Biologian Seura Vanamo ry:lle, Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistys ry:n Betty Väänäsen rahastolle sekä Oulun Luonnonystävien yhdistys ry:lle.

## 7 Lähteet

Adamo SA. **2017**. The stress response and immune system share, borrow, and reconfigure their physiological network elements: Evidence from the insects. *Hormones and Behavior* **88**: 25–30.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. **1990**. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.

Andersen C., Ledet-Jensen J & Ørntoft T. **2004**. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization - applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* **64**: 5245–5250.

Aubert A & Richard FJ. **2008**. Social management of LPS-induced inflammation in *Formica polyctena* ants. *Brain, Behavior, and Immunity*. **22**: 833–837.

Bar-Joseph Z, Gitter A & Simon I. **2012**. Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nature Reviews Genetics* **13**: 552–564.



Barribeau S, Sadd B, du Plessis L, Brown M, Buechel S, Cappelle K, Carolan J, Christiaens O, Colgan T, Erler S, Evans J, Helbing S, Karaus E, Lattorff H, Marxer M, Meeus I, Näpflin K, Niu J, Schmid-Hempel R, Smagghe G, Waterhouse R, Yu N, Zdobnov E & Schmid-Hempel P. **2015**. A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biology* **16**: 83.

Bourke AFG & Franks NG. **1995**. Social Evolution in Ants. *Princeton University Press*, New Jersey, Yhdysvallat.

Brütsch T, Jaffuel G, Vallat A, Turlings T & Chapuisat M. **2017**. Wood ants produce a potent antimicrobial agent by applying formic acid on tree-collected resin. *Ecology and Evolution* **7**: 2249–2254.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J & Wittwer CT. **2009**. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**: 611–622.

Chapuisat M, Oppliger A, Magliano P & Christe P. **2007**. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proceedings of the Royal Society B* **274**: 2013–2017.

Cremer S, Armitage SAO & Schmid-Hempel P. **2007**. Social Immunity. *Current Biology* **17**: 693–702.

Elsik CG, Tayal A, Diesh CM, Unni DR, Emery ML, Nguyen HN & Hagen DE. **2016**. Hymenoptera Genome Database: integrating genome annotations in HymenopteraMine. *Nucleic Acids Research* **44**: 793–800.

Erler S, Popp M & Lattorff HMG. **2011**. Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLoS ONE* **6**: e18126.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler J-L, Jiang H, Thompson G, Kanost M, Zou Z & Hultmark D. **2006**. Immune pathways and defence mechanisms in honeybees *Apis mellifera*. *Insect Mol.Biol.* **15**: 645–656.

Exilpatriot. **2015**: Large worker ant found in Southern California. Haettu osoitteesta [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Argentine\\_Ant\\_\(Linepithema\\_Humile\).jpeg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Argentine_Ant_(Linepithema_Humile).jpeg), CC-BY: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.fi>.

Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C & Hoffmann JA. **2007**. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* **7**: 862–874.

Flyg C, Kenne K & Boman HG. **1980**. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol.* **120**: 173–81.

Gadau J, Helmkampf M, Nygaard S, Roux J, Simola DF, Smith CR, Suen G, Wurm Y & Smith CD. **2012**. The genomic impact of 100 million years of social evolution in seven ant species. *Trends Genet.* **28**: 14–21.

Gerardo NA, Itincicek B, Anselme C, Atamian H, Barribeau S, De Vos M, Duncan E, Evans J, Gabaldón T, Ghanim M, Heddi A, Kaloshian I, Latorre A, Moya A, Nakabachi A, Parker B, Pérez-Brocal V, Pignatelli M, Rahbé Y, Ramsey J, Spragg C, Tamames J, Tamarit D, Tamborindeguy C, Vincent-Monegat C & Vilcinskis A. **2010**. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol.* **11**: R21.

Gillespie JP, Kanost MR & Trenczek T. **1997**. Biological mediators of insect immunity. *Annu.Rev. Entomol.* **4269**: 611–643.

Giraud T, Pedersen J & Keller L. **2002**. Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. *PNAS* **99**: 6075–6079.

Hamilton C, Lejeune B & Rosengaus R. **2010**. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biol.Lett.* **7**: 89–92.

Heinze J & Walter B. **2010**. Moribund ants leave their nests to die in social isolation. *Curr.Biol.* **20**: 249–252.

Holway DA, Lach LL, Suarez AV, Tsutsui ND & Case TJ. **2002**. The causes and consequences of ant invasions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 181–233.

Honeybee Genome Sequencing Consortium. **2006**. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**: 931–949.

Hölldobler B & Wilson EO. **1990**. The Ants. *Cambridge, MA: Belknap*.

Janeway C & Medzhitov R. **2002**. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197–216.

Johnston PR & Rolff J. **2013**. Immune- and wound-dependent differential gene expression in an ancient insect. *Developmental and Comparative Immunology* **40**: 320–324.

Jpant. **2006**. Simplified drawing of ant. Haettu osoitteesta  
<https://fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Muurahainen-2.svg>, CC-BY:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.fi>.

Kennedy P, Baron G, Qiu B, Freitak D, Helanterä H, Hunt E, Manfredini F, O'Shea-Wheller T, Patalano S, Pull C, Sasaki T, Taylor D, Wyatt C & Sumner S. **2017**. Deconstructing Superorganisms and Societies to Address Big Questions in Biology. *Trends in Ecology & Evolution* **32**: 861–872.

Kesäniemi J, Koskimäki JJ & Jurvansuu J. **2019**. Corpse management of the invasive Argentine ant inhibits growth of pathogenic fungi. *Scientific Reports*, **9**: 7593.

Kohlmeier P, Holländer K & Meunier J. **2016**. Survival after pathogen exposure in group-living insects: don't forget the stress of social isolation! *Journal of evolutionary biology* **29**: 1867–1872.

Koto A, Mersch D, Hollis B & Keller L. **2015**. Social isolation causes mortality by disrupting energy homeostasis in ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **69**: 583–591.

Lemaitre B & Hoffmann J. **2007**. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 697–743.

Ligoxygakis P. **2017**. Immunity: Insect Immune Memory Goes Viral. *Current Biology* **27**: R1218–R1220.

Madden, T. **2005**. The BLAST sequence analysis tool. *NCBI Handbook*. National Library of Medicine, Bethesda, MD, Yhdysvallat

Nolan T, Hands RE & Bustin SA. **2006**. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* **1**: 1559–1582.

Nuotclà J, Biedermann P & Taborsky M. **2019**. Pathogen defence is a potential driver of social evolution in ambrosia beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**: 1917

Otani S, Bos N & Yek S. **2016**. Transitional complexity of social insect immunity. *Frontiers in Ecology and Evolution* **4**: 69.

Pedersen JS, Krieger MJB, Vogel V, Giraud T & Keller L. **2006**. Native supercolonies of unrelated individuals in the invasive Argentine ant. *Evolution* **60**: 782–791.

Pull C, Metzler S, Naderlinger E & Cremer S. **2018**. Protection against the lethal side effects of social immunity in ants. *Current Biology* **28**: R1139–R1140.

Ratzka C, Liang C, Dandekar T, Gross R & Feldhaar H. **2011**. Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**: 529–536.

Richard F-J, Aubert A & Grozinger CM. **2008**. Modulation of social interactions by immune stimulation in honeybee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* **6**: artikkeli 50.

Sackton TB & Clark AG. **2009**. Comparative profiling of the transcriptional response to infection in two species of *Drosophila* by short-read cDNA sequencing. *BMC Genomics* **10**: 259.

Sackton TB. **2019**. Comparative genomics and transcriptomics of host–pathogen interactions in insects: evolutionary insights and future directions. *Current Opinion in Insect Science* **31**: 106–113.

Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ & Jacobs FJ. **2008**. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The honeybee, *Apis mellifera*, head after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science* **8**: artikkeli 33.

Simola DF, Wissler L, Donahue G, Waterhouse RM, Helmkampf M, Roux J, Nygaard S, Glastad KM, Hagen DE, Viljakainen L, Reese JT, Hunt BG, Graur D, Elhaik E, Kriventseva EV, Wen J, Parker BJ, Cash E, Privman E, Childers CT, Munoz-Torres MC, Boomsma JJ, Bornberg-Bauer E, Currie CR, Elsik CG, Suen G, Goodisman MAD, Keller L, Liebig J, Rawls A, Reinberg D, Smith CD, Smith CR, Tsutsui N, Wurm Y, Zdobnov EM, Berger SL & Gadau J. **2013**. Social insect genomes exhibit dramatic evolution in gene composition and regulation while preserving regulatory features linked to sociality. *Genome Research* **23**: 1235–1247.

Simone M, Evans J & Spivak M. **2009**. Resin collection and social immunity in honeybees. *Evolution* **63**: 3016–3022.

Smith CD, Zimin A, Holt C, Abouheif E, Benton R, Cash E, Croset V, Currie CR, Elhaik E, Elsik CG, Fave M-J, Fernandes V, Gadau J, Gibson JD, Graur D, Grubbs KJ, Hagen DE, Helmkampf M, Holley J-A, Hu H, So A, Viniegra I, Johnson BR, Johnson RM, Khila A, Kim JW, Laird J, Mathis KA, Moeller JA, Muñoz-Torres MC, Murphy MC, Nakamura R, Nigam S, Overson RP, Placek JE, Rajakumar R, Reese JT, Robertson HM, Smith CR, Suarez AV, Suen G, Suhr EL, Tao S, Torres CW, van Wilgenburg E, Viljakainen L, Walden KKO, Wild AL, Yandell M, Yorke JA & Tsutsui ND. **2010**. Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). *PNAS* **108**: 5673–5678.

Stucki D, Freitak D & Sundström L. **2017**. Survival and gene expression under different temperature and humidity regimes in ants. *PLoS ONE* **12(7)**: e0181137

Suarez AV, Holway DA & Case TJ. **2000**. Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: Insights from Argentine ants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 1095–1100.

Suarez AV, Holway DA, & Tsutsui ND. **2008**. Genetics and Behavior of a Colonizing Species: The Invasive Argentine Ant. *The American Naturalist* **172**: S72–S84.

Suen G, Teiling C, Li L, Holt C, Abouheif E, Bornberg-Bauer E, Bouffard P, Caldera E, Cash E, Cavanaugh A, Denas O, Elhaik E, Favé M, Gadau J, Gibson J, Graur D, Grubbs K, Hagen D, Harkins T, Helmkamp M, Hu H, Johnson B, Kim J, Marsh S, Moeller J, Muñoz-Torres MC, Murphy M, Naughton M, Nigam S, Overson R, Rajakumar R, Reese J, Scott J, Smith C, Tao S, Tsutsui N, Viljakainen L, Wissler L, Yandell M, Zimmer F, Taylor J, Slater S, Clifton S, Warren W, Elsik C, Smith C, Weinstock G, Gerardo N & Currie C. **2011**. The Genome Sequence of the Leaf-Cutter Ant *Atta cephalotes* Reveals Insights into Its Obligate Symbiotic Lifestyle. *PLoS Genet* **7**: e1002007.

Theis F, Ugelvig L, Marr C & Cremer S. **2015**. Opposing effects of allogrooming on disease transmission in ant societies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**: 1669.

Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA & Case TJ. **2000**. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 5948–5953.

Ugelvig LV & Cremer S. **2007**. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Curr.Biol.* **17**: 1967–1971.

Ugelvig LV, Kronauer D, Schrempf A, Heinze J & Cremer S. **2010**. Rapid anti-pathogen response in ant societies relies on high genetic diversity. *Proc.R.Soc.B*. Published online.

Ugelvig LV & Cremer S. **2012**. Effects of social immunity and unicoloniality on host–parasite interactions in invasive insect societies. *Functional Ecology* **26**: 1300–1312.

Van Meyel S, Körner M & Meunier J. **2018**. Social immunity: why we should study its nature, evolution and functions across all social systems. *Current Opinion in Insect Science* **28**: 1–7.

Vásquez GM & Silverman J. **2008**. Intraspecific aggression and colony fusion in the Argentine ant. *Animal Behaviour* **75**: 583–593.

- Viljakainen L, Evans JD, Hasselmann M, Rueppell O, Tingek S & Pamilo P. **2009**. Rapid Evolution of Immune Proteins in Social Insects. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 1791–1801.
- Viljakainen L. **2015**. Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Briefings in Functional Genomics* **14**: 407–412.
- Viljakainen L, Jurvansuu J, Holmberg I, Pamminger T, Erler S & Cremer S. **2018**. Social environment affects the transcriptomic response to bacteria in ant queens. *Ecology and Evolution*. **8**: 11031–11070.
- Vogel V, Pedersen J, D'Ettorre P, Lehmann L & Keller L. **2009**. Dynamics and Genetic Structure of Argentine Ant Supercolonies in Their Native Range. *Evolution* **63**: 1627–1639.
- Vogel V, Pedersen J, Giraud T, Krieger M & Keller L. **2010**. The worldwide expansion of the Argentine ant. *Divers.Distrib.* **16**: 170–186.
- Wang Z, Gerstein M & Snyder M. **2009**. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat.Rev.Genet.* **10**: 57–63.
- Ward PS. **2014**. The Phylogeny and Evolution of Ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **45**: 23–43.
- Wickham H. **2016**. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wild A. **2009**. Evolution of the Neotropical ant genus *Linepithema*. *Syst.Entomol.* **34**: 49–62.
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman N & Starks P. **2009**. Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **54**: 405–423.